



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 31/20, A23L 1/30 // A61K 31/23, A23L 2/00	A1	(11) 国際公開番号 WO97/05863 (43) 国際公開日 1997年2月20日(20.02.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02231 (22) 国際出願日 1996年8月7日(07.08.96) (30) 優先権データ 特願平7/201050 1995年8月7日(07.08.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 吉村聡通(YOSHIMURA, Satomichi)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市奈佐原2-6-9-501 Osaka, (JP) 秋元健吾(AKIMOTO, Kengo)[JP/JP] 〒618 大阪府三島郡島本町山崎1-9-5-1006 Osaka, (JP) 松井雅司(MATSUI, Masashi)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市千里山東2-17, E-103 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AU, CA, JP, KR, LT, LV, SI, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PREVENTIVE OR REMEDY FOR DISEASES CAUSED BY ABNORMALITIES IN CARTILAGE TISSUES (54) 発明の名称 軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬 (57) Abstract A preventive or remedy for diseases caused by abnormalities in cartilage tissues or a drink or food therefor which comprises as the active ingredient an omega-9 unsaturated fatty acid.		

BEST AVAILABLE COPY

“ (57) 要約

オメガ9系不飽和脂肪酸を有効成分とする軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬、又は飲食品。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	イギリス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	ババルバドス	GE	ジョージア	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GU	グアム	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MD	モルドバ共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MG	マダガスカル	TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CN	中国	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	VN	ベトナム
				NZ	ニュージーランド		

明 細 書

軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬

技術分野

本発明は、オメガ9系不飽和脂肪酸を有効成分とする、軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬、並びに軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法に関するものである。より詳細には、6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも1つを有効成分とする関節症、変形性関節症、変形性膝関節症、肩関節周囲炎、変形性脊椎症等の軟骨変性を伴う疾患の予防又は治療薬、並びに関節の疼痛、運動痛や、関節の可動域制限、関節の腫張、水腫等の予防又は改善作用を有する飲食品及びその製造方法に関するものである。

背景技術

関節症は軟骨変性を起こす何らかの原疾患があって発症する二次性関節症と、特定の原疾患がない一次性関節症に大別され、膝関節に最も多くみられるが、肘、股、足及び指関節にもみられる。病変の主体は軟骨の変性とそれに対する修復機転であり、病変が進行すると滑膜の変化や軟骨下骨の破壊や関節辺縁部の軟骨肥大あるいは骨新生が起こる。

また変形性関節症は、関節に慢性の退行性変化及び増殖性変化が同時に起こり、関節の形態が変化する疾患であり、一次性変形性関節症と二次性変形性関節症に大別される。前者は中年以降にみられ、老化現象に加え、力学的ストレスが加わって発症し、後者は若年

者にもみられ、関節の外傷、形態異常、疾患、代謝異常など明らかな原因を有するものに続発して生じるものである。さらに組織学的には軟骨の生化学的変化の結果、軟骨の摩耗が起こり、軟骨の粘弾性の低下とともに亀裂が徐々に深部までに及ぶものである。また変形性脊椎症は、脊柱の退行性変性による病変であり、年齢的变化が主体であるが、体質的素因、職業などの環境因子、広義の外傷などの関与も考えられている（以上「医学大辞典 1991. 3. 25 発行 南山堂」より）。

特に一次性変形性関節症については、近年人口構成の高齢化を背景としてその患者数の増大が社会問題の一つとなっている。変形性関節症の薬物療法としては、関節軟骨及び骨膜の炎症を抑える目的で非ステロイド性消炎鎮痛剤の投与や、ステロイド剤の関節腔内注射が行われてきたが、いずれも対症療法であり、軟骨の破壊等の進行を止めるにはおよばず満足すべき効果は得られていないのが現状である。

また、機械的ストレス等による外因性の軟骨破壊に対する防護剤として高分子ヒアルロン酸製剤が開発され治療に用いられているが、本質的な治療薬とはいえない。近年、軟骨細胞に対する生化学的研究の進展に伴って明らかになってきた軟骨細胞自身の代謝異常による内因性の軟骨破壊の改善剤や、変形性関節症でよく見られる軟骨の欠如及び変性した軟骨を再生するような原因療法剤は知られておらず、その開発が強く望まれている。

発明の開示

従って本発明は、軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬、特に関節症、変形性関節症、肩関節周囲炎、変形性脊椎症等の軟骨変性を伴う疾患の治療薬として有効で、かつ比較的、副作用が

小さく、慢性症状への適用が可能な薬剤、並びに軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する新規な飲食品を提供しようとするものである。

軟骨組織は、間葉由来の組織の中では極めて例外的に無血管の組織であるが、正常軟骨組織中においても脂質は存在している（Ann Rheum Dis 24 123-135, 1965）。しかし脂質の過剰な蓄積が、例えばリポヘム関節症（J. Bone Joint Surg[Am] 52 1147-1158, 1970）やブレコシヤス関節症（Arthritis Rheum 24 965-968, 1981）において、その病理像として認めることができる。さらに変形性関節症においても脂質代謝の異常が病態と相関すること（Metabolism 40 571-576, 1991）が報告されている。

またウサギ関節内に脂質を投与することにより、実験的に変形性関節症様の関節炎を誘発できること（J. Anat 133 309-314, 1981）や、必須脂肪酸欠乏ウイスターラットにおいて、軟骨への $^{35}\text{S}\text{O}_4$ の取り込みが減少すること（Arthritis Rheum 14 379 1971）、さらには*in vitro*において、軟骨細胞の正常な増殖には、脂質の供給が必要であること（Exp Cell Res 145 415-423, 1983）といった報告から、適度な脂質の量及び適度な脂肪酸組成が軟骨細胞の正常な代謝や機能の維持に重要であると考えられている。

しかしながら、関節炎のイニシエーションや、増悪の過程において、上述の脂質変化が果たす役割については、充分研究されておらず、さらには関節症、特に変形性関節症の治療に脂質の投与が有効か否かについては不明である。一方、オメガ9系不飽和脂肪酸が軟骨組織に局在し老化に伴って含有比率が低下すること（FASEB J 5 344-353, 1991）が知られており、軟骨細胞の機能維持に重要であると考えられている。また、5, 8, 11-エイコサトリエン酸についてはラットカラゲニン浮腫モデルにおいて抗炎症作用が確認さ

れているが、関節症における薬理作用については、殆ど知られていない。

そこで、本発明者らは、上記課題を解決するために、種々の不飽和脂肪酸の研究を行い、5，8，11-エイコサトリエン酸が軟骨の変性を抑制する作用を有し、軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療に極めて有効であることを見出し、本発明を完成した。

図面の簡単な説明

図1は、ウサギ変形性関節炎モデルにおけるミード酸の治療効果を示すグラフである。

図2は、ウサギ変形性関節炎モデルにおける関節軟骨組織中のアラキドン酸／ミード酸比を示すグラフである。

図3は、軟骨細胞によるⅡ型コラーゲンの合成に及ぼす各種脂肪酸の影響を示す電気泳動図である。

発明の実施の形態

本発明の有効成分であるオメガ9系不飽和脂肪酸とは、5，8，11-エイコサトリエン酸であるが、生体内でこの脂肪酸に容易に変換されて、5，8，11-エイコサトリエン酸の効果を発揮する6，9-オクタデカジエン酸、又は8，11-エイコサジエン酸も用いることができる。またこれらはそれぞれ単独でまたは組み合わせて使用することができる。

本発明の脂肪酸は、シス型、トランス型のいずれの幾何異性体であってもよいが、天然に存在するオメガ9系不飽和脂肪酸のほとんどがシス型であるため、本発明の飲食品に用いる場合には、シス型のオメガ9系不飽和脂肪酸を使用することが好ましい。

また本発明のオメガ 9 系不飽和脂肪酸は遊離脂肪酸の形態で用いることができるが、薬剤として許容されうる塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、又は他のアルカリ金属塩、亜鉛塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のような他の金属の塩の形態や、モノ、ジ、トリグリセライド、低級アルコールのエステル、リン脂質、糖脂質、アミド等の種々の形態で使用してもよく、とくにエチルエステルやトリグリセリドが好ましい。ここで低級アルコールとは炭素数 6 以下の一価アルコールをさし、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノールなどを例示することができる。またこれらはそれぞれ単独でまたは混合して使用することができる。

本発明に使用するオメガ 9 系不飽和脂肪酸の供給源は何であっても構わない。すなわちオメガ 9 系不飽和脂肪酸を生成することができる微生物や、必須脂肪酸欠乏に陥った動物組織、必須脂肪酸欠乏に陥った動物培養細胞によって産生されたものであっても、化学的又は酵素的に合成されたものであっても、また天然物、例えば動物の軟骨から抽出・分離・精製されたものであってもよい。

オメガ 9 系不飽和脂肪酸を生成することができる微生物とは具体的には特開平 5 - 9 1 8 8 8 号に記載されている $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性及び $\Delta 6$ 不飽和化酵素活性を有しかつ $\Delta 12$ 不飽和化酵素活性の低下または欠失した微生物、例えばモルティエラ・アルピナ S A M 1 8 6 1 (F E R M B P - 3 5 9 0) を使用することができる。

遊離のオメガ 9 系不飽和脂肪酸又はそのエステルは、上記のオメガ 9 系不飽和脂肪酸含有物から常法に従って、抽出・分離・精製することができる。例えば微生物から得る場合には、培養菌体から例えば *n* - ヘキサンなどによる有機溶媒抽出や超臨界炭酸ガス抽出処

理により得られた油脂に、加水分解及びエステル化操作を行い、遊離脂肪酸混合物、又は脂肪酸エステル混合物とした後、尿素分画法、液々分配クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー等により、目的とする6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び5, 8, 11-エイコサトリエン酸等の遊離脂肪酸又は脂肪酸エステルを純度80%以上で得ることができる。さらに詳細には、特開平5-91888号に記載されている方法により抽出・分離精製を行うことができる。

本発明の有効成分であるオメガ9系不飽和脂肪酸は、必ずしも高純度精製品に限ったことはなく、オメガ9系不飽和脂肪酸を含有する油脂（該油脂中にはオメガ9系不飽和脂肪酸を有するトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、リン脂質、糖脂質、あるいは遊離のオメガ9系不飽和脂肪酸又はそのエステルが存在し得る）やオメガ9系不飽和脂肪酸を含有する遊離脂肪酸混合物又は脂肪酸エステル混合物を使用することができる。

オメガ9系不飽和脂肪酸を含有する油脂は、オメガ9系不飽和脂肪酸を生成することができる微生物の培養菌体から、菌体を破壊し、例えばn-ヘキサンなどによる有機溶媒抽出処理や超臨界炭酸ガス抽出処理によって得ることができる。またオメガ9系不飽和脂肪酸を含有する天然物から常法により抽出することによって得ることができる。そして該油脂に加水分解及びエステル化操作を行うことにより、オメガ9系不飽和脂肪酸を含有する遊離脂肪酸混合物又は脂肪酸エステル混合物を得ることができる。より具体的には特開平5-91888号に記載されている方法により培養菌体から抽出・分離することができる。

本発明の脂肪酸は、常法に従って経口又は非経口の形態で、医薬品、医薬部外品、化粧品、健康食品、機能性食品、栄養補助食品、

老人用食品、飲食品の分野で利用することができる。

本発明の対象となる軟骨組織の異常に起因する疾患としては、例えば膝や肘、股、足、指、肩関節等の関節症や変形性関節症、変形性膝関節症、肩関節周囲炎、変形性脊椎症等が挙げられ、もちろんこれらの疾患に起因する種々の医学的症状も本発明の対象となり、例えば変形性関節症の症状として知られる関節のこわばり、運動痛、関節可動域制限、関節の腫張や、変形性膝関節症の症状として知られる疼痛、特に運動痛、運動制限、関節水腫や、変形性脊椎症の症状として知られる頸痛、背痛、腰痛、手足ときには体幹部の放散痛、しびれ、脱力といった神経根ないし脊髄症状、高度麻痺や膀胱・直腸障害、間欠性跛行、あるいは冷感等の種々の症状が挙げられる。なお本発明の脂肪酸は選択的に軟骨変性を抑制するため比較的、副作用が小さく、慢性症状への適用が可能である。

本発明の有効成分を医薬品として用いる場合、投与形態は、経口投与または非経口投与が都合よく行われるものであればどのような剤形のものであってもよく、例えば注射剤（乳濁性、懸濁性、非水性など）、あるいは用時乳濁又は懸濁して用いる固形注射剤の形で、輸液、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、腸溶剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、外用液剤、湿布剤、点鼻剤、吸入剤、軟膏剤、ローション剤、坐剤、経腸栄養剤等を挙げることができ、これらを症状に応じてそれぞれ単独で、または組み合わせて使用することができる。これら各種製剤は、主薬に薬理学的、製剤学的に認容される製造助剤を加えることにより常法に従って製剤化することができる。

上記製造助剤としては、内服用製剤（経口剤）、注射用製剤（注射剤）、粘膜投与剤（バッカル、トローチ、坐剤等）、外用剤（軟膏、貼付剤等）などの投与経路に応じた適当な製剤用成分が使用さ

れる。例えば、経口剤及び粘膜投与剤にあっては、賦形剤（例えば澱粉、乳糖、結晶セルロース、乳糖カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、無水ケイ酸）、崩壊剤（例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、アルギン酸ナトリウム）、滑沢剤（例えばステアリン酸マグネシウム、硫酸パラフィン、タルク）、結合剤（例えばジメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン）、コーティング剤（例えばヒドロキシエチルセルロース）、矯味剤、着色剤、香味剤などの製剤用成分が、また注射剤にあっては、水性注射剤を構成し得る溶解剤ないし溶解補助剤（例えば注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、グリセリン）、懸濁化剤（例えばポリソルベート 80、ツイーン 80 などの界面活性剤、アラビアゴム溶液）、pH 調整剤（例えば有機酸又はその金属塩）、安定剤などの製剤用成分が、さらに外用剤にあっては、水性ないし油性の溶解剤ないし溶解補助剤（例えばアルコール、脂肪酸エステル類）、粘着剤（例えばカルボキシビニルポリマー、多糖類）、乳化剤（例えば界面活性剤）などの製剤用成分が使用される。また本発明の脂肪酸は不飽和脂肪酸であるため、ブチレート化ヒドロキシトルエン、ブチレート化ヒドロキシアニソール、プロピルガレート、医薬として許容されうるキノンおよび α -トコフェロール等の抗酸化剤を含有させることが望ましい。特に関節症や変形性関節症、変形性膝関節症、肩関節周囲炎等の治療に際しては、例えば本発明の有効成分を水性溶媒に懸濁し、pH を 6.0 ~ 7.0 に、0.9 % 生理食塩水に対する浸透圧比を 0.8 ~ 1.2 に調節し、関節腔内への投与製剤として調製することができる。前記水性溶媒としては、例えば生理食塩水、3 ~ 5 % ブドウ糖液、3 ~ 5 % キシリトール液、リン酸緩衝液などを使用することができる。

また注射剤を調製する場合の可溶化剤としては、例えば医薬品用の非イオン界面活性剤等を使用することができ、さらに具体的には、本発明の有効成分を1/2倍容量のPOE(60)硬化ヒマシ油あるいはPOEソルビタンモノオレート等の非イオン界面活性剤と完全に混合させ、生理食塩水で希釈することで調製することができる。必要に応じて適宜等張化剤、酸化安定剤(亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウムなど)、防腐剤(安息香酸、サリチル酸など)、無痛化剤などを加えてもよい。

また本発明の予防又は治療薬においては、本発明の有効成分の他に、ヒアルロン酸等の従来から軟骨組織の異常に起因する疾患の治療に使用されている薬剤や、副腎皮質ホルモン薬、局所麻酔薬、抗生物質などを配合してもよい。

また本発明の有効成分の投与量は、投与の目的や投与対象者の状況(性別、年齢、体重等)により異なるが、通常、成人に対して本発明のオメガ9系不飽和脂肪酸の総量が、経口投与の場合、1日あたり1~5000mg、好ましくは1~2000mg、さらに好ましくは1~1000mgの範囲で、また非経口投与の場合、1日あたり0.1~500mg、好ましくは0.1~200mg、さらに好ましくは0.1~100mgの範囲で適宜調節して投与することができる。

特に関節症や変形性関節症、変形性膝関節症、肩関節周囲炎等の治療に際しては、成人1人あたり1回0.1~500mg、好ましくは0.1~200mgの割合で関節腔内に注入し、これを1~7日間に1回の割合で行うことができる。しかしながら、上市されている高分子ヒアルロン酸製剤が、機械的ストレスの防護剤としての性質上、関節腔内への注入に限定されるのに対し、本発明の脂肪酸は軟骨組織の変性を抑制する作用を有しているため、本発明の投与方法は関節腔内に注入することに限定されるものではなく、経口投与あ

るいは経腸栄養や経皮吸収など種々の方法をとることができる。

本発明の有効成分である脂肪酸は、生体内で必須脂肪酸欠乏状態時に生合成されることが知られており、7週令のICR雄性マウスに対し、2 g/day/kgを2週間連投（経口投与）したところ、何ら異常な症状は認められなかったことから安全性の面で優れているのは明らかである。

本発明の脂肪酸を飲食品として用いる場合、その形態は、固形、あるいは液状の食品ないしは嗜好品のいずれであってもよい。

例えば油脂を含む食品として肉、魚、ナッツ等の油脂を含む天然食品、中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、かりん糖等の熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、クッキー、ケーキ、アイスクリーム等の油脂食品又は加工時に油脂を加えた加工食品、おかき、ハードビスケット、あんパン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧又は塗布した食品等を挙げることができるが、油脂を含む食品に限定しているわけではなく、例えばパン、めん類、ごはん、菓子類（キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、和菓子）、豆腐およびその加工品などの農産食品、清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、味噌などの発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージなどの畜農食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶などの飲料等を挙げることができる。

本発明の飲食品は、所定量の6，9-オクタデカジエン酸、8，11-エイコサジエン酸、及び5，8，11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも1種以上のオメガ9系不飽和脂肪酸、又はこれを主成分とする抽出物を、オメガ9系不飽和脂肪酸を実質

上含有しない飲食品原料とともに配合し、一般の製造法により加工製造することができる。その配合量は剤形、食品の形態性状により異なるが、一般には食品全量に対して0.001重量%以上、好ましくは0.1重量%以上、より好ましくは1重量%以上が好ましいが特に限定されるものではない。

ここでオメガ9系不飽和脂肪酸を実質上含有しない飲食品原料とは、オメガ9系不飽和脂肪酸の含量が微量であるため、その飲食品原料が配合された最終製品の1日摂取量において6,9-オクタデカジエン酸、8,11-エイコサジエン酸、及び5,8,11-エイコサトリエン酸の総含量が1mg未満のもの、好ましくは2mg未満のもの、あるいは5,8,11-エイコサトリエン酸含量が1mg未満のもの、好ましくは2mg未満のものを挙げることができる。

また、本発明において、オメガ9系不飽和脂肪酸を主成分とする抽出物とは、オメガ9系不飽和脂肪酸を生産することができる微生物の培養菌体から、菌体を破壊し、例えばn-ヘキサンなどによる有機溶媒抽出処理や超臨界炭酸ガス抽出処理によって、あるいはオメガ9系不飽和脂肪酸を含有する天然物から常法により抽出することによって得られるオメガ9系不飽和脂肪酸を含有する油脂（該油脂中にはオメガ9系不飽和脂肪酸を有するトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、リン脂質、糖脂質、あるいは遊離のオメガ9系不飽和脂肪酸又はそのエステル等が存在し得る）や、オメガ9系不飽和脂肪酸を含有する遊離脂肪酸混合物又は脂肪酸エステル混合物を挙げることができる。なお該抽出物のオメガ9系不飽和脂肪酸の含量は1%以上、好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上がよく、特に5,8,11-エイコサトリエン酸の含量は1%以上、好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上がよい。

特に健康食品、機能性食品、栄養補助食品、老人用食品として用

いる場合には、形態としては、前記医薬製剤の形態であっても、また例えば蛋白質（蛋白質源としてはアミノ酸バランスのとれた栄養価の高い乳蛋白質、大豆蛋白質、卵アルブミン等の蛋白質が最も広く使用されるが、これらの分解物、卵白のオリゴペプチド、大豆加水分解物等の他、アミノ酸単体の混合物も使用される）、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等に本発明の脂肪酸が配合された自然流動食、半消化態栄養食および成分栄養食や、ドリンク剤、カプセル剤、経腸栄養剤等の加工形態をあげることができるが、前記飲食品の形態であってもよい。

本発明の健康食品、機能性食品、栄養補助食品又は老人用食品は、オメガ9系不飽和脂肪酸及び／又はオメガ9系不飽和脂肪酸を主成分とする抽出物を用いて、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤、自然流動食、半消化態栄養食、成分栄養食、経腸栄養剤等の形態として製造することができる。より具体的には、本発明のオメガ9系不飽和脂肪酸を1%以上、好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上含有する油脂を用いて、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤、自然流動食、半消化態栄養食、成分栄養食、経腸栄養剤等の形態として製造することができる。この際、本発明のオメガ9系不飽和脂肪酸を含有する油脂とともにいずれの栄養成分あるいは機能性成分を配合してもよい。

また医師の指示に基づく栄養士の管理下に、病院給食の調理の際に任意の食品に本発明の脂肪酸を加え、その場で調整した食事を、軟骨変性に起因する医学的症状を呈する患者に与えることもできる。

本発明の軟骨組織の異常に起因する医学的症状としては、例えば

膝や肘、股、足、指、肩関節等の関節症や変形性関節症、変形性膝関節症、肩関節周囲炎、変形性脊椎症等の疾患に起因する種々の医学的症状が挙げられ、より具体的には例えば変形性関節症の症状として知られる関節のこわばり、運動痛、関節可動域制限、関節の腫張や、変形性膝関節症の症状として知られる疼痛、特に運動痛、運動制限、関節水腫や、変形性脊椎症の症状として知られる頸痛、背痛、腰痛、手足ときには体幹部の放散痛、しびれ、脱力といった神経根ないし脊髄症状、高度麻痺や膀胱・直腸障害、間欠性跛行、あるいは冷感等の種々の症状を挙げることができる。

本発明の脂肪酸を含有する飲食品は、軟骨組織の異常に起因する医学的症状に対する予防改善や健康維持を目的として、目安として1日あたり本発明のオメガ9系不飽和脂肪酸の総量が、1～5000mg、好ましくは1～2000mg、さらに好ましくは1～1000mgの範囲で経口摂取されることが望ましい。

実施例

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

実施例 1. オメガ9系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を用いた5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステルの製造方法

オメガ9系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物として、特開平5-91888号に記載されている $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性及び $\Delta 6$ 不飽和化酵素活性を有しかつ $\Delta 12$ 不飽和化酵素活性の欠失したモルティエラ・アルピナSAM1861 (FERM BP-3590)を用い、グルコース2%、酵母エキス1%、オリブ油0.1%を含む培地(7ton、pH6.3)を10tonタンクに入れ滅菌後、温度24℃(培養初日から培養10日目)、20℃(培養10日目か

ら培養12日目)、通気量1.0vvm、攪拌50rpmの条件下でモルティエレラ・アルピナSAM1861の通気攪拌培養を12日間実施した。なお、グルコースの流下培養を行いトータルとしてグルコース3.49%添加した。培養終了後、造粒乾燥によりオメガ9系不飽和脂肪酸含有油脂を32.7%含む乾燥菌体6.8kg得た。得られた乾燥菌体から含有油脂をヘキサンで抽出し、常法により精製し、オメガ9系不飽和脂肪酸含有油脂(6,9-シス-オクタジエン酸13.2%、8,11-シス-エイコサジエン酸3.5%、5,8,11-シス-エイコサトリエン酸11.2%)20kg得た。そして、常法に従って、得られた油脂をエチルエステル化工程、真空蒸留工程、高速液体クロマトグラフ精製工程を経て、5,8,11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステル(5,8,11-シス-エイコサトリエン酸90.1%、6,9-シス-オクタジエン酸7.9%、オレイン酸1.4%、アラキジン酸0.6%)260g得た。

実施例2.

関節ギブス固定法により変形性関節症モデルを作製した。動物は12週齢の雄ウサギ(Kb1:NZW、北山ラベス株式会社)を用いた。2mg/Kgのキシラジン塩酸塩(セラクター、バイエル株式会社)及び50mg/Kgの塩酸ケタミン(動物用ケタラール50、三共株式会社)の筋肉内投与による麻酔下(以下、麻酔下とする)にて、右後肢を毛刈りし、大腿上部より足尖までをストッキネットとキャストパッドで包んだ後、キャストリングテープ(以上、スリーエム薬品株式会社)を用いて膝関節を伸屈位で3週間、固定した。

ギブス固定期間終了時に異常の認められなかった動物を用いて、体重および関節可動域を指標として、各群の平均体重及び関節可動域値が均一になるように1群4~5匹の4群に割り付けた。

投与サンプルは、実施例1で得た90%の5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステル（以下「ミード酸」という）と62.5 μ lのHCO-60（POE（60）硬化ヒマシ油、日光ケミカルズ株式会社）を完全に混合したのち、100mlの生理食塩水に懸濁し、ミード酸1mg/ml溶液を調製した。別に62.5 μ lのHCO-60を100mlの生理食塩水に溶かし、低用量サンプル調製用及び溶剤投与群用として使用した。

投与群は以下の様に設定した。（1）溶剤投与群：0.6ml/関節、（2）ミード酸低用量投与群：0.12mgミード酸/関節、（3）ミード酸高用量投与群：0.60mgミード酸/関節、（4）アルツ（商標）（生化学工業株式会社）：0.6ml（6mgの高分子ヒアルロン酸ナトリウムを含む）/関節。投与は麻酔下で投与部位を毛刈りし、2%イソジン液（動物用イソジン液、明治製菓株式会社）および70%エタノールで消毒した後、ディスポーザブル注射器（注射針：25G）を用いて行なった。右膝関節腔内に投与検体を週2回、5週間投与した。薬効評価として関節可動域の測定は週1回、麻酔下で約400gの加重を脛骨軸に直角に加えて、大腿骨との間に形成される角度を測定した。（最大伸展角）－（最大屈曲角）の差を右膝関節の可動域（ROM）とした。

試験期間中飼料は固形飼料RC4（オリエンタル酵母工業株式会社）を、飲料水は公共水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

試験終了後、関節の病理学的検査を行なった。すなわち、ペントバルビタールナトリウム溶液（ネンブタール注射液、ダイナボット株式会社）の耳介静脈内投与による麻酔下で膝関節の外表観察およびROM測定を行なった後、放血致死させた。全例の両後肢を摘出した後、膝関節腔内を肉眼的に観察し、写真撮影した。また、全例について大腿骨、脛骨骨頭および滑膜を採取し、10%中性緩衝ホ

ルマリン液で固定し、EDTA脱灰を施した。包埋、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）およびサフラニンO染色を施し、鏡検した。

右膝関節のROMを図1に示す。投与開始1週間後、ミード酸高用量群及びアルツ（商標）投与群では有意にROMが上昇し、5週目には、拘束前値87%にまで回復した。ミード酸低用量群においても投与後2週目から回復傾向が認められた。投与終了時の軟骨組織の脂肪酸組成の解析結果を図2に示す。無処置ウサギの関節軟骨組織のアラキドン酸／ミード酸比（ARA／MA）に対し、溶媒投与群では高値、ミード酸投与群では正常化する傾向があることが明らかとなった。

実施例3.

実施例1と同様の手法により調製した95%の6, 9-シス-オクタデカジエン酸エチルエステル125 μ l、又は95%の8, 11-シス-エイコサジエン酸エチルエステル125 μ lを、62.5 μ lのHCO-60（POE（60）硬化ヒマシ油、日光ケミカルズ株式会社）と完全に混合した後、100mlの生理食塩水に懸濁し、6, 9-シス-オクタデカジエン酸エチルエステル1mg/ml溶液（溶液A）、又は8, 11-シス-エイコサジエン酸エチルエステル1mg/ml溶液（溶液B）を調製した。別に62.5 μ lのHCO-60を100mlの生理食塩水に溶かし溶剤投与群用として使用した。

実施例2に従って、関節ギプス固定法により変形性膝関節症モデルを作製し、各群の平均体重及び関節可動域値が均一になるように1群5匹の3群に割り付けた。投与群は以下の様に設定した。（1）溶剤投与群：0.6ml／関節、（2）6, 9-シス-オクタデカジエン酸エチルエステル投与群：0.6ml 溶液A／関節、（3）

8, 11-シス-エイコサジエン酸エチルエステル投与群: 0.6 ml 溶液B/関節。実施例2に従って、右膝関節腔内に投与検体を週2回、5週間投与し、右膝関節の可動域(ROM)を測定した。

その結果、投与開始5週目の可動域は、溶剤投与群、溶液A投与群、溶液B投与群でそれぞれ、70%、80.2%、83.6%であり、有意な回復効果が認められた。

実施例4. ソフトカプセル剤の製造

ゼラチン	70.0%
グルセリン	22.9%
パラオキシ安息香酸メチル	0.15%
パラオキシ安息香酸プロピル	0.51%
水	適量
計	100%

上記成分からなるソフトカプセル剤皮の中に、5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステルを、常法により充填し、1粒180mgのソフトカプセル剤を得た。

実施例5. ソフトカプセル剤の製造

オメガ9系不飽和脂肪酸生産菌SAM1861より、特開平5-91888号公報の記載に従って調製したオメガ9系不飽和脂肪酸含有トリグリセリド油(6, 9-シス-オクタデカジエン酸14.5重量%、8, 11-シス-エイコサジエン酸2.3重量%、5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸17.4重量%含有)99.7%に、 α -トコフェロール0.3重量%を添加した油状質を、実施例4に示した成分からなるソフトカプセル剤皮に、常法により充填し、1粒180mgのソフトカプセル剤を得た。

実施例6. ジュースの製造

β -シクロデキストリン2を20%エタノール水溶液20mlに添

加し、ここにスターラーで攪拌しながら、5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステル 100 mgを加え、50℃で2時間インキュベートした。室温冷却（約1時間）後、さらに攪拌を続けながら4℃で10時間インキュベートした。生成した沈殿を、遠心分離により回収し、n-ヘキサンで洗浄後、凍結乾燥を行い5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステル含有シクロデキストリン包接化合物 1.8 gを得た。この粉末 1 gをジュース 10 リットルに均一に混ぜ合わせ、5, 8, 11-シス-エイコサトリエン酸エチルエステル含有ジュースを調製した。

実施例 7. (脂肪輸液剤)

5, 8, 11-エイコサトリエン酸エチルエステル 40 g、精製大豆油 360 g、精製卵黄レシチン 48 g、オレイン酸 20 g、濃グリセリン 100 g、0.1 N-苛性ソーダ 40 mlを加え、ホモミキサーで分散させたのち、注射用蒸留水を加え全液量を4リットルとする。これを高圧噴射式乳化機にて乳化し、脂質乳液を調製した。該脂質乳液を200 mlずつプラスチック製バッグに分注したのち、121℃、20分間、高圧蒸気滅菌処理して脂肪輸液剤とする。

実施例 8. (乳濁性注射液)

90重量% 5, 8, 11-エイコサトリエン酸エチルエステルを、常法に従って下記の処方で乳濁性注射液として調製した。乳濁性注射液中のミード酸エチルエステルの含量は15% (W/V)であり、乳化剤として卵黄レシチン 1.2% (W/V)を加え、更に血液と等張となるようにグリセリンにて浸透圧を調整した。

実施例 9. (乳濁性注射液)

実施例 5 で使用したオメガ 9 系不飽和脂肪酸含有トリグリセリド油を、常法に従って乳濁性注射液として調製した。乳濁性注射液中のオメガ 9 系不飽和脂肪酸含有トリグリセリド油の含量は10% (

W/V)であり、乳化剤として卵黄レシチン1.2% (W/V)を加え、更に血液と等張となるようにグリセリンにて浸透圧を調整した。

実施例10.

ウサギ膝関節軟骨細胞初代培養系を用いてタイプIIコラーゲンの合成に与えるミード酸の影響を他の脂肪酸、特にアラキドン酸と比較した。使用した脂肪酸としてミード酸の場合は実施例1と同様の手法によりさらに純度を高めた99%5, 8, 11-シス-エイコサテトラエン酸エチルエステルを、アラキドン酸、オレイン酸及びリノール酸の場合は市販の99%エチルエステルを使用した。4週齢日本産白色種ウサギ膝関節より鈴木・下村らの方法に従って軟骨細胞を調製した〔Shimomura, Y., Yoneda, T., Suzuki, F. Osteogenesis by chondrocyte from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Int.*, 19:179 -187, 1975.〕軟骨細胞は、10%牛胎児血清含有 α MEM培地(50 μ g/mlビタミンC、1 ng/ml b-FGF添加)にて、96穴プレート(イワキガラス社製)に1万細胞/穴となるようにまき、2日間前培養(5%CO₂, 37°C)した。脂肪酸は用事調製とし0.0625% HCO-60に懸濁した。脂肪酸による前処理として、プレートを3群に分けそれぞれ、同培地にA群:溶媒(0.0625% HCO-60)、B群:ミード酸(最終濃度300 μ M)、C群:アラキドン酸(最終濃度300 μ M)を加え2日毎に培地及び脂肪酸を交換し約5日間培養した。

次いで、培地を血清無添加 α MEM培地(1 μ g/mlトランスフェリン、1 μ Mデキサメタゾン、2 μ g/mlインシュリン、50 μ g/mlビタミンC)に換え、最終濃度として300 μ Mになるよう各脂肪酸(ミード酸、アラキドン酸、オレイン酸、及びリノール酸

）を添加して7日間培養し、細胞外マトリックスを合成させた。培地及び各脂肪酸は、2日毎に新しく調製し交換した。その後、プレートにペプシン（2 mg/ml）酢酸液を200 μ l/穴ずつ加え、37℃24時間処理した。各穴より残査を回収し1万5千回転10分間の遠心処理により生じた沈殿をトリス-EDTA緩衝液（pH 8.0）にて1回洗浄しSDSサンプルバッファ100 μ lに溶解した。

タイプIIコラーゲンの合成量は、各サンプル液1/10体積量をマルチゲル4/20（第一化学社製）にて電気泳動し、クマシーブリリアントブルー染色後の116 kD付近のバンドの濃淡により調べた。染色後のゲルの写真を図3に示す。アラキドン酸（300 μ M）の添加により、タイプIIコラーゲンの合成が阻害されることが判明した（図3、サンプル番号1～5）。またこの阻害は、アラキドン酸にて前処理したC群の結果でより顕著に現われたが、ミード酸（300 μ M）の添加により回復した（図3、サンプル番号11～15）。アラキドン酸によるタイプIIコラーゲンの合成阻害を回復させる作用は、ミード酸に特徴的で他のオレイン酸やリノール酸には、認められなかった。さらに、ミード酸（300 μ M）にて前処理したB群の結果から、ミード酸の前処理によりアラキドン酸添加によるタイプIIコラーゲン合成量の低下が、抑制されることが判明した（図3、サンプル番号6～10）。

請 求 の 範 囲

1. オメガ 9 系不飽和脂肪酸を含んで成る、軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬。
2. オメガ 9 系不飽和脂肪酸が 6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも 1 つである、請求項 1 記載の軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬。
3. 軟骨組織の異常に起因する疾患が関節症である、請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療薬。
4. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性関節症である、請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療薬。
5. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性膝関節症である、請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療薬。
6. 軟骨組織の異常に起因する疾患が肩関節周囲炎である、請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療薬。
7. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性脊椎症である、請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療薬。
8. オメガ 9 系不飽和脂肪酸及び／又はこれを主成分とする抽出物を含んで成る、軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品。
9. オメガ 9 系不飽和脂肪酸が 6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも 1 つである、請求項 8 記載の飲食品。
10. 前記飲食品が機能性食品である、請求項 8 又は 9 記載の飲食品。

11. 前記飲食品が栄養補助食品である、請求項 8 又は 9 記載の軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品。

12. 前記飲食品が老人用食品である、請求項 8 又は 9 記載の軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品。

13. 前記飲食品が、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤又は経腸栄養剤の形態である、請求項 8 ～ 12 のいずれか 1 項記載の軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品。

14. 軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品の製造法であって、オメガ 9 系不飽和脂肪酸及び／又はこれを主成分とする抽出物を単独で、あるいはオメガ 9 系不飽和脂肪酸を実質上含有しない飲食品原料とともに配合することを特徴とする方法。

15. オメガ 9 系不飽和脂肪酸を、その投与が必要な対象に投与することを含んで成る、軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療方法。

16. オメガ 9 系不飽和脂肪酸が 6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも 1 つである、請求項 15 記載の方法。

17. 軟骨組織の異常に起因する疾患が関節症である、請求項 15 又は 16 記載の方法。

18. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性関節症である、請求項 15 又は 16 記載の方法。

19. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性膝関節症である、請

求項 15 又は 16 記載の方法。

20. 軟骨組織の異常に起因する疾患が肩関節周囲炎である、請求項 15 又は 16 記載の方法。

21. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性脊椎症である、請求項 15 又は 16 記載の方法。

22. オメガ 9 系不飽和脂肪酸を飲食品原料に添加することを含んで成る、請求項 15 ～ 21 記載の方法。

23. オメガ 9 系不飽和脂肪酸及び／又はこれを主成分とする抽出物を飲食品原料に添加することを含んで成る、軟骨組織の異常に起因する医学的症状の予防又は改善作用を有する飲食品の製造方法。

24. オメガ 9 系不飽和脂肪酸が 6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン酸の群から選ばれた少なくとも 1 つである、請求項 23 記載の方法。

25. 前記飲食品が機能性食品である、請求項 23 又は 24 記載の方法。

26. 前記飲食品が栄養補助食品である、請求項 23 又は 24 記載の方法。

27. 前記飲食品が老人用食品である、請求項 23 又は 24 記載の方法。

28. 前記飲食品が、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤又は経腸栄養剤の形態である、請求項 23 ～ 27 のいずれか 1 項記載の方法。

29. 軟骨組織の異常に起因する疾患の予防又は治療薬の製造のためのオメガ 9 系不飽和脂肪酸の使用。

30. オメガ 9 系不飽和脂肪酸が 6, 9-オクタデカジエン酸、8, 11-エイコサジエン酸、及び 5, 8, 11-エイコサトリエン

酸の群から選ばれた少なくとも 1 つである、請求項 29 記載の使用。

31. 軟骨組織の異常に起因する疾患が関節症である、請求項 29 又は 30 記載の使用。

32. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性関節症である、請求項 29 又は 30 記載の使用。

33. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性膝関節症である、請求項 29 又は 30 記載の使用。

34. 軟骨組織の異常に起因する疾患が肩関節周囲炎である、請求項 29 又は 30 記載の使用。

35. 軟骨組織の異常に起因する疾患が変形性脊椎症である、請求項 29 又は 30 記載の使用。

Fig.1

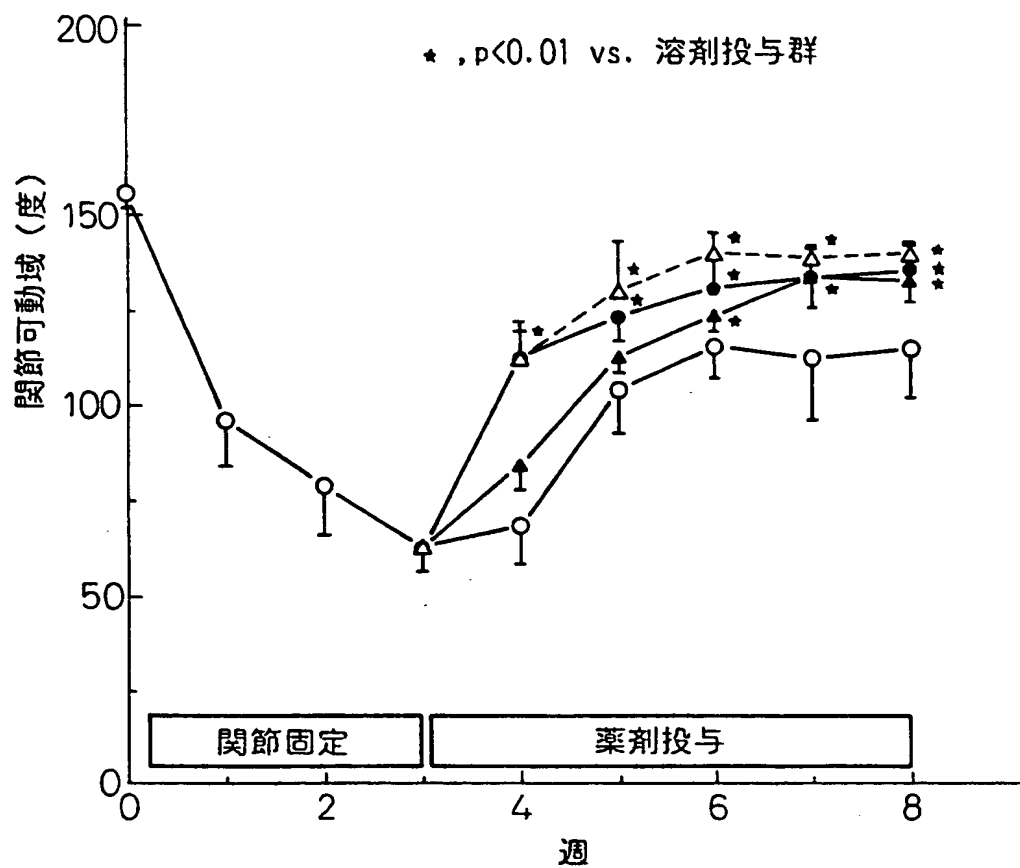


Fig. 2

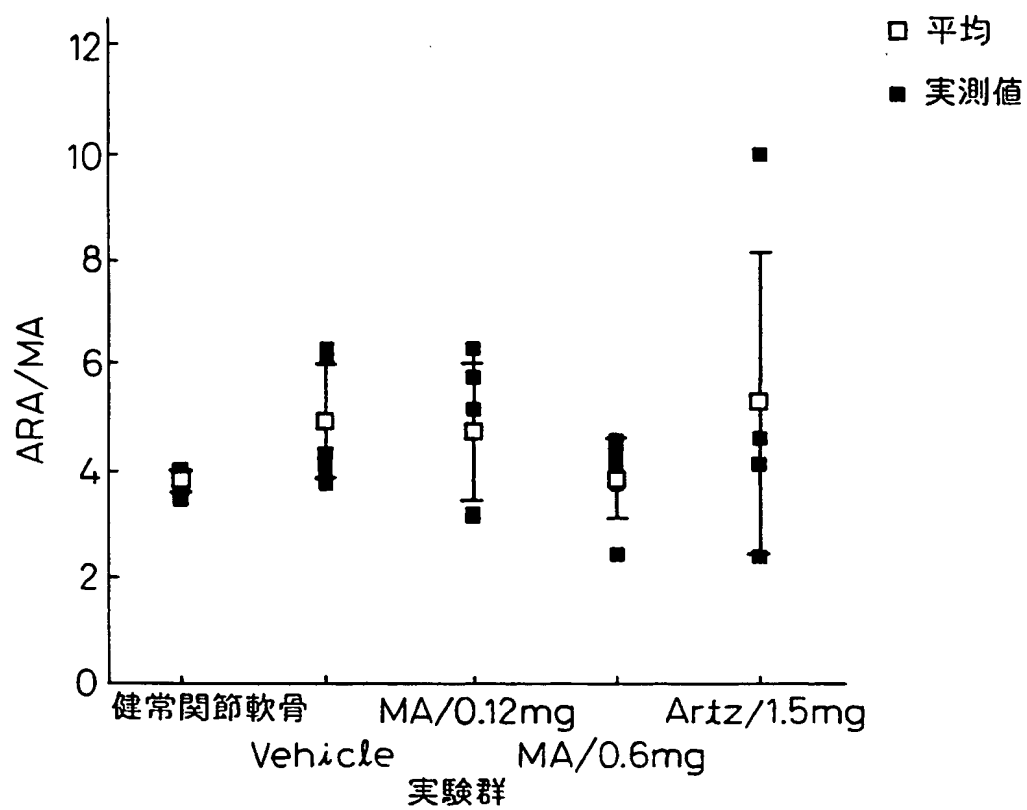
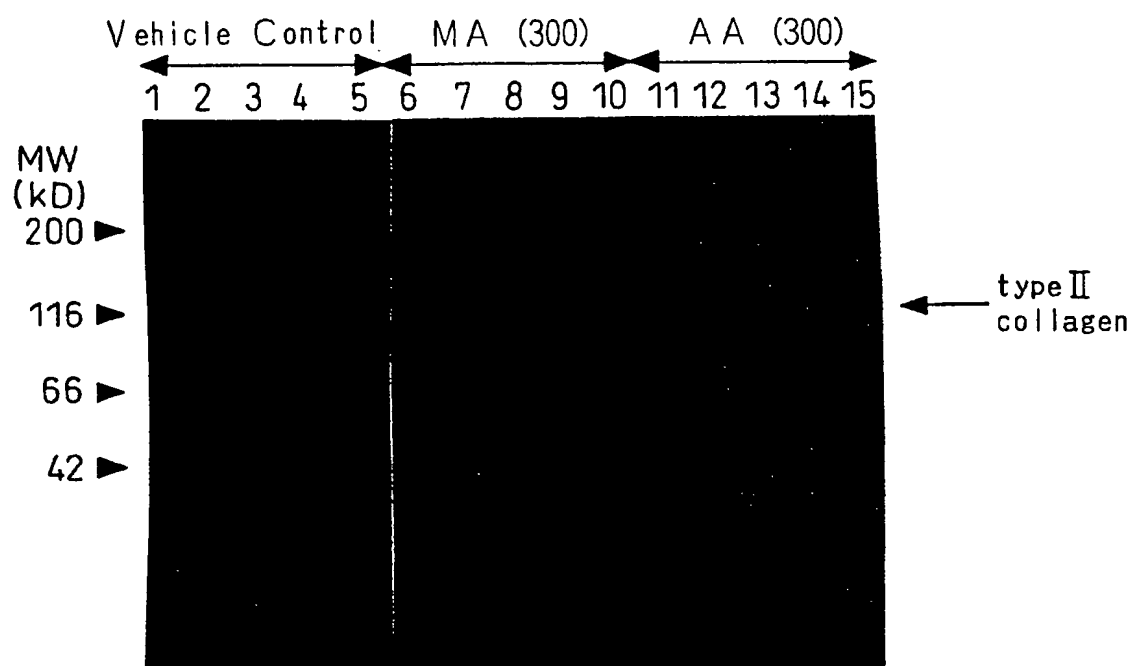


Fig.3



No.	samples
1, 6, 11	Vehicle Control
2, 7, 12	MA (300)
3, 8, 13	AA (300)
4, 9, 14	OA (300)
5, 10, 15	LA (300)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K31/20, A23L1/30 // A61K31/23, A23L2/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K31/20, A23L1/30 // A61K31/23, A23L2/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-41421, A (Suntory Ltd.), February 10, 1995 (10. 02. 95), Page 7, example 6 & EP, 635266, A1	1 - 14, 23 - 35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 5, 1996 (05. 11. 96)

Date of mailing of the international search report

November 19, 1996 (19. 11. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02231

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15 - 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 to 22 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A 61 K 31/20, A 23 L 1/30 // A 61 K 31/23, A 23 L 2/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A 61 K 31/20, A 23 L 1/30 // A 61 K 31/23, A 23 L 2/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 7-41421, A (サントリー株式会社) 10. 2月. 1995 (10. 02. 95) 第7頁、実施例6 & E P, 635266, A1	1-14, 23-35

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 11. 96

国際調査報告の発送日

19.11.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

4 C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲15-22は、治療による人体又は動物の体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.